

# DISCUSSIÓ

1. Abans del gen *MECP2*

2. El gen *MECP2*



---

L'RTT és la segona causa de retard mental en dones, després de la síndrome de Down. Les pacients RTT neixen i es desenvolupen amb aparent normalitat fins al voltant de l'any de vida, quan s'inicia la conducta autista i la pèrdua de les adquisicions. Cap als cinc anys, la majoria han perdut la capacitat de parlar i d'utilitzar les mans, mostren retard mental sever, pateixen convulsions i no es mantenen dretes. El descobriment del gen causant de l'RTT pel grup liderat per la Dra. Huda Zoghbi al *Baylor College of Medicine* (Houston) l'any 1999, va obrir una porta a l'esperança a la comunitat científica, però també i molt especialment a totes les famílies afectades per aquesta síndrome, la prevalença de la qual és aproximadament 1/12000-1/15000.

En els últims quatre anys s'han publicat més de 200 articles relacionats amb l'RTT, el gen *MECP2* i la seva proteïna. S'ha treballat intensament en l'espectre de mutacions del gen, i en l'estudi de la funció i localització de MeCP2, amb la finalitat de comprendre com el dèficit aquesta proteïna pot causar el fenotip RTT. Encara que l'RTT sigui una malaltia monogènica, *MECP2* és un gen regulador, inhibidor de la transcripció. El seu dèficit, per tant, causa un defecte de dosi en els productes dels gens diana de MeCP2, amb efectes pleiotròpics sobre processos fonamentals del desenvolupament.

Els estudis realitzats en aquesta tesi han servit per diagnosticar genèticament les pacients espanyoles i augmentar l'espectre de mutacions del gen *MECP2* a la població mundial. Ha permès oferir consell genètic i diagnòstic prenatal a les famílies amb una filla prèvia afectada d'RTT, fet que alleugera notablement l'angoixa paterna. D'altra banda, hem buscat altres estratègies d'estudi de mutacions per intentar esbrinar si l'RTT és una malaltia genèticament homogènia. L'estudi de les regions promotores (màster realitzat parcialment per E. González al nostre grup de recerca), va desencadenar la possibilitat d'identificar un factor de transcripció específic de cervell que podria modular l'expressió de MeCP2 en SNC; i els estudis a nivell de cDNA van permetre detectar que el gen *MECP2* podria generar dues isoformes de la proteïna per *splicing* alternatiu en regió codificant, fenomen fins ara no descrit.

La Discussió General es dividirà en dues parts. En la primera es discutiran els resultats obtinguts en aquesta tesi abans que s'identifiqués el gen *MECP2* com a causant de l'RTT. La segona part es basarà en la discussió del gruix de la tesi, després del descobriment del gen *MECP2*. S'ha dividit en tres subapartats: l'anàlisi de mutacions en el gen *MECP2* comparant-lo amb els resultats publicats per la resta de grups que treballen en l'RTT; possibles vies de recerca per continuar estudiant l'homogeneïtat/heterogeneïtat genètica de la malaltia; i per últim, he dedicat un subapartat a l'estudi de les correlacions clíniques de la malaltia amb les mutacions trobades a *MECP2*, i a les repercussions clíniques i familiars del diagnòstic genètic.



## 1. ABANS DEL GEN MECP2

### 1.1 Estudis en el cromosoma X

El patró d'herència de l'RTT havia estat sempre molt discutit. Abans d'identificar-se el gen *MECP2* com a causant de la malaltia, s'havien plantejat diversos models per explicar la seva base genètica. La hipòtesi més acceptada era que estàvem davant d'una malaltia dominant lligada al cromosoma X, letal en hemizigosi (Clark, 1996). L'absència d'una major proporció d'avortaments, o de letalitat neonatal de barons en el nucli familiar d'afectades, podia ser explicada per una elevada proporció de mutacions *de novo*, preferentment en la línia germinal paterna. La incidència relativament alta de l'RTT (estimada en 1/12000-1/15000) implicava una alta taxa de mutació del gen responsable.

Un dels nostres primers objectius va ser refinar la localització del gen causant de l'RTT en el cromosoma X mitjançant anàlisi de desequilibri de lligament, sota la hipòtesi que l'RTT podia estar causada per una mutació dinàmica lligada al cromosoma X (Hofferbert i col. 1997). Degut a l'existència d'un efecte fundador en les malalties causades per mutació dinàmica (Akesson i col. 1992, 1995, 1996), el locus s'associaria a un o pocs haplotips en desequilibri. L'estudi es completà només per a les regions Xp22, Xq11 i Xq12, sense detectar desequilibri de lligament per a cap marcador, i es va abandonar al descriure's mutacions *de novo* en el gen *MECP2* en les pacients (Amir i col. 1999).

D'altra banda, els resultats de l'anàlisi de concordança/discordança de marcadors del cromosoma X realitzat en el nostre cas familiar, format per dues germanes amb forma congènita d'RTT, van ser concordants amb els estudis previs de cartografiat del locus, encara que no va permetre aportar dades per a un mapatge més fi. Les zones de concordança entre les dues germanes van ser Xp22-Xp11 i Xq27-Xq28, i les prèviament descrites eren Xp22 i Xq28. El gen *MECP2* està localitzat a Xq28.

### 1.2 Estudis en el DNA mitocondrial

Degut a que l'RTT tenia una expressió limitada al sexe (només pacients dones es reconeixien com a pacients RTT), la majoria de les investigacions es van centrar en el cromosoma X. Però una de les hipòtesis que també s'havia plantejat era que l'mtDNA podria jugar un paper important en la patogènesi de la malaltia. S'havien observat patrons d'herència materna en algunes de les famílies RTT estudiades, i anomalies morfològiques i funcionals mitocondrials en algunes de les pacients (Coker i col. 1991; Mak i col. 1993; Dotti i col. 1993), pel que no es descartava trobar una base genètica de la malaltia basada en mutacions en l'mtDNA.

El grup de Tang i col. (1997) va trobar mutacions al 16S rRNA en pacients i en les seves mares. Per confirmar els seus resultats, vam emprar la metodologia descrita per aquests autors en la nostra població. Ni l'anàlisi directa de la mutació 2835C→T mitjançant mismatch PCR i digestió amb *SacI*, ni l'anàlisi indirecta d'SSCP/HD, no van permetre detectar la mutació descrita, ni cap canvi en el patró de migració en les pacients respecte de la població control. Els nostres resultats concordaven amb els resultats de Cardioli i col. (1999), que van sortir publicats mentre el nostre manuscrit estava en revisió, els quals tampoc no van trobar canvis en pacients italianes. Podem concloure que les mutacions descrites pel grup xinès no estaven presents a la nostra població i que, per tant, no tenien relació causativa amb la malaltia



## 2. EL GEN *MECP2*

La presència de mutacions en el gen *MECP2* en una proporció de pacients va confirmar que l'RTT és una malaltia dominant lligada al cromosoma X, causada per mutacions *de novo* en més d'un 99% del casos.

El gen *MECP2* té una expressió ubiqüa i dóna lloc a la proteïna MeCP2. Estudis *in vitro* havien mostrat que MeCP2 és capaç de silenciar cromatina metilada a l'unir-se a un complex corepressor format per HDAC i Sin3A (Ng i col. 1999). Prèviament s'havia proposat que MeCP2 actuava com a repressor transcripcional global que previndria de la transcripció generalitzada al llarg del genoma (Nan i col. 1997). Però, podia ser que l'RTT estigués causada per una transcripció inespecífica excessiva, deguda a un defecte general en el silenciament gènic? El fet que les pacients RTT no mostrin anomalies durant els primers mesos de vida implica que el programa d'expressió dels gens responsables del desenvolupament no es troba alterat en absència de MeCP2. Així doncs, per què el cervell és l'òrgan més afectat en aquesta patologia, i per què aquesta s'inicia al voltant de l'any? Donat que l'expressió de *MECP2* és més elevada en cervell que en altres teixits (Nan i col. 1997), una primera proposta va ser que el cervell podria ser més sensible al desajust transcripcional causat per les mutacions en el gen *MECP2*, mentre que en la resta de teixits la seva funció podria ser realitzada per altres repressors amb funció redundant. També es va proposar que el SNC podria necessitar major quantitat de MeCP2 per mantenir els nivells de transcripció a un nivell més baix que els d'altres teixits. No obstant, aquestes explicacions eren hipòtesis sense base experimental. Caldria identificar els gens diana de MeCP2 i avaluar la seva infra o sobreexpressió, particularment en el SNC, per poder explicar la base molecular de l'RTT.

### 2.1 Anàlisi de mutacions en el gen *MECP2*

#### 2.1.1 Espectre de mutacions del gen *MECP2* en pacients RTT

El gen *MECP2* és un gen amb una elevada taxa de mutació. Es detecten canvis de novo tant en regions codificants (més del 99% de les pacients RTT són esporàdiques) com en regions no codificants. El 72% de mutacions i polimorfismes són deguts a canvis C→T. S'ha suggerit que la conversió de citosina a timina es deu a una deaminació espontània del residu citosina metilat en posició 4 de l'anell de carboni (Goto & Monk, 1998), reflectint la inherent hipermutabilitat dels dinucleòtids CpG (Krawczak i col. 1998). El 68% dels canvis mutacionals C→T es produeixen en residus arginina, els quals constitueixen el 7% dels aminoàcids totals de la proteïna i estan altament conservats al llarg de l'evolució, des d'humans fins a *Xenopus sp* (Webb & Latif, 2001).

Els resultats obtinguts pel nostre grup estan en concordança amb els publicats a la pàgina web RettBASE (*MECP2* Data Retrieval, <http://mecp2.chw.edu.au/mecp2/>), on es recull l'espectre de mutacions i polimorfismes del gen *MECP2* detectats per tots els centres que hi treballen. A la Taula 8 es troben resumits els resultats del nombre de pacients analitzats amb mutació, el número de mutacions trobades, i la localització de les mutacions en relació als dominis funcionals de MeCP2.

**Taula 8.** Comparació de les dades sobre l'anàlisi de mutacions del gen *MECP2* obtingudes a nivell mundial i en la població espanyola.

	<b>RettBASE (%)</b>	<b>Població espanyola (%)</b>
N. pacients amb mutació	1275	118
<i>N. pacients amb mutació recurrent</i>	1130 (89%)	96 (81%)
N. de mutacions diferents	238	35
<i>N. de mutacions recurrents</i>	93 (39%)	13 (37%)
Mutacions diferents a l'MBD	59 (25%)	8 (23%)
Mutacions diferents al TRD	71 (30%)	11 (31%)
Mutacions diferents a l'NLS	12 (5%)	2 (6%)
<b>Total mutacions en dominis funcionals</b>	<b>60%</b>	<b>60%</b>
Mutacions diferents a C-ter (deleccions i reordenaments)	69 (29%)	5 (14%)
Individus amb mutació a l'MBD	338 (26%)	33 (28%)
Individus amb mutació al TRD	421 (33%)	45 (38%)
Individus amb mutació a l'NLS	146 (11%)	21 (18%)
<b>Total individus amb mutació en dominis funcionals</b>	<b>70%</b>	<b>84%</b>
Individus amb mutació a C-ter	108 (8%)	9 (8%)

Com es pot observar a la taula 8, les xifres obtingudes a la nostra població són molt similars a les descrites en el conjunt mundial. Tot i que el número de mutacions trobades a nivell mundial en el gen *MECP2* és elevat i només el 39% són recurrents, aquestes explicarien el 70% dels pacients amb mutació. Les mutacions estan localitzades en els dominis descrits com a funcionals en el 60% dels casos, causant una disminució o pèrdua de funció de la proteïna tal i com demostren els estudis realitzats per Ballestar i col. (2000), Yusufzai & Wolffe, (2000), Free i col. (2001) i Kudo i col. (2001 i 2002). El nostre grup ha observat conclusions similars, amb l'única variació que hem trobat més nombre d'individus amb mutació en dominis funcionals (84%) que en la població mundial (70%). Aquesta discrepància s'explica a l'analitzar les mutacions recurrents, com veurem més endavant. En el recull de dades mundials es troba un número elevat de mutacions en la regió C-ter per a poca quantitat de pacients, respecte del trobat en els altres dominis funcionals, que són majoritàriament mutacions recurrents. Les mutacions trobades a la regió C-ter rares vegades són recurrents (per tractar-se de deleccions o reordenaments complexos deguts a la presència de repeticions quasi palindròmiques de pentanucleòtids a la regió) pel que augmenten considerablement el percentatge de mutacions en aquesta regió, fent augmentar el percentatge total de mutacions diferents trobades a mesura que augmenta la població analitzada.

Si es comparen les mutacions recurrents (Taula 9), s'observa que hi ha 8 mutacions que poden explicar un 80% de les pacients amb mutació en la regió codificant del gen *MECP2*. També observem que la mutació més recurrent a la població espanyola (R255X) no és la mutació més recurrent trobada a la població mundial (T158M). Tot i que el volum de pacients analitzats en aquesta tesi és considerable, és un ordre de magnitud inferior al recull mundial, i probablement les diferències trobades són degudes a un biaix mostral. L'anàlisi d'un menor nombre de pacients ha fet disminuir el nombre de mutacions úniques i, per tant, exagera la proporció de les recurrents, les quals es localitzen preferentment en els dominis funcionals.



**Taula 9.** Comparació de les mutacions recurrents trobades en el gen *MECP2* a la població mundial i a la població espanyola.

<i>RettBASE</i> canvi nt (aa)	% del total	% recu- rrents	<i>Població espanyola</i> canvi nt (aa)	% del total	% recu- rrents
473C→T(T158M)	9,6%	11,6%	763C→T(R255X)	14,4%	17,7%
502C→T(R168X)	9,5%	11,4%	473C→T(T158M)	13%	15,6%
763C→T(R255X)	8,2%	9,9%	502C→T(R168X)	13%	15,6%
808C→T(R207X)	7,4%	8,9%	808C→T(R207X)	9,3%	11,4%
880C→T(R294X)	6%	7,3%	397C→T(R133C)	5%	6,25%
916C→T(R306C)	5%	5,9%	806delG(V288X)	5%	6,25%
397C→T(R133C)	4%	4,7%	916C→T(R306C)	5%	6,25%
316C→T(R106W)	3,6%	4,4%	880C→T(R294X)	4,2%	5,2%
455C→G(P152R)	1,6%	2%	455C→G(P152R)	3,4%	4,2%
806delG(V288X)	1,4%	1,7%	1164del44pb(PTC389)	3,4%	4,2%
317C→T(R106Q)	0,5%	0,6%	316C→T(R106W)	2,5%	3%
1157del41(PTC388)	5x10 <sup>-3</sup> %	6x10 <sup>-3</sup> %	1157del44pb(PTC388)	1,7%	2%
Altres	26,6%	31,6%	317C→T(R106Q)	1,7%	2%
<b>Totals</b>	<b>83%</b>	<b>100%</b>	<b>Totals</b>	<b>82%</b>	<b>100%</b>

En aquesta tesi s'han trobat diferents variants nucleotídiques suposadament silencioses en la regió codificant del gen, en regió intrònica i en regió no codificant, algunes *de novo* i altres heretades. A la població mundial també s'han trobat canvis polimòrfics en pacients RTT, tal i com mostra la Taula 10.

Les variants polimòrfiques detectades són canvis que no s'han trobat a la població control, o s'han trobat en una freqüència molt baixa. En general, els canvis nucleotídics que no produeixen canvi d'aminoàcid solen ser considerats canvis silenciosos. No obstant, s'han descrit canvis suposadament silenciosos a nivell genòmic que tenen realment efectes patogènics quan s'analitza el cDNA, ja que alteren senyals críptiques d'*splicing* que repercuteixen en el processament de l'RNA i/o en els nivells d'expressió de la proteïna. Altres canvis considerats polimorfismes en regió no codificant poden també afectar l'expressió del gen (Ars i col. 2001). Per tant, caldria realitzar estudis funcionals en aquells canvis no detectats en població control abans de poder afirmar que són polimorfismes.

En la nostra sèrie vam trobar dos canvis localitzats més enllà del codó STOP i abans del primer senyal de poliadenilació. El canvi +14ntG→A tenia un origen patern. L'altre canvi (+99insA) tenia un origen *de novo* i va ser detectat també en l'RNA de la pacient. La seva presència en l'RNA indica que la inserció no afecta la transcripció ni l'estabilitat del transcrit curt de *MECP2*. No obstant, no es pot descartar una repercussió fenotípica sense realitzar més anàlisis ja que es localitza en una seqüència altament conservada i, tal i com apunten estudis recents (Balmer i col. 2003), la regió 3'UTR de *MECP2* podria estar relacionada amb l'especificitat d'expressió del transcrit curt respecte del llarg, tant en l'espai com en el temps al llarg del desenvolupament pre i postnatal. Per aquests motius serà necessari mesurar el nivell d'expressió de la proteïna MeCP2 de la pacient, i analitzar possibles efectes sobre el transcrit llarg, del que desconexim la funció.

**Taula 10.** Variants trobades a la població mundial i a l'espanyola.

N. pacients pob. mundial	N. pacients pob. espanyola	Canvi nt	Canvi aa	Localització del canvi
1		168C→T	P56P	N-ter
2		375C→A	I125I	MBD
7	4	IVS3-17delT		Intró 3
1		393C→G	A131A	MBD
4		426C→T	F142F	MBD
1		438C→T	G146G	MBD
1		474G→A	T158T	MBD
18	1	582C→T	S194S	entre MBD i TRD
1	1	666C→G	V222V	TRD
3		695G→C	G232G	TRD
1	1	710G→T	G237G	TRD
2	1	750C→T	R250R	TRD
3		777C→T	A259A	TRD-NLS
1		819G→T	G273G	TRD
3		834C→T	A278A	TRD
1		840C→T	R280R	TRD
1		843C→T	A281A	TRD
1		849C→G	A283A	TRD
11		897C→T	T299T	TRD
1		903C→T	L301L	TRD
1			I314I	C-ter
3		984C→T	L328L	C-ter
1		999G→T	G333G	C-ter
3		1035A→G	K345K	C-ter
1			P355P	C-ter
2		1071C→T	S357S	C-ter
1		1104C→T	H368H	C-ter
1		1137C→T	P379P	C-ter
1		1160C→T	P387P	C-ter
1		1161C→T	P387P	C-ter
1		1176G→A	E392E	C-ter
2	1	1197C→T	P399P	C-ter
7	1	1233C→T	S411S	C-ter
3		1326C→T	T442T	C-ter
2		1335G→A	T445T	C-ter
1	1	+15ntG→A		després TGA

### 2.1.2 Punt calent de reordenaments en la regió C-ter del gen *MECP2*

Ja s'ha comentat que la majoria de mutacions descrites a l'RTT afecten als dominis funcionals TRD (33%), MBD (26,6%) i NLS (11,4%), donant com a resultat una pèrdua de funció de la proteïna. S'ha descrit un punt calent de reordenaments, principalment delecions, a la regió C-ter de la proteïna, més enllà del domini TRD. Fins la data s'han descrit més de 70 reordenaments en aquesta regió que donarien lloc a un

canvi en la pauta de lectura, creant un codó STOP prematur. La proteïna truncada resultant mantén intactes els dominis d'unió al DNA, de localització nuclear i catalític. Encara que l'extrem C-ter no té una funció determinada coneguda, la patogenicitat de les proteïnes truncades detectades en les pacients demostra que la regió és necessària per a la funcionalitat de MeCP2. En aquest sentit, el ratolí transgènic que millor mimetitza l'RTT clàssica té delecionada la regió C-ter a partir de l'aminoàcid 308, causant una proteïna a la que falta la tercera part de la regió codificant (Shahbazian i col. 2002c). Els ratolins presenten un cúmul d'histones deacetilases en cervell, suggerint que la regió C-ter delecionada podria estar relacionada amb la unió de MeCP2 al complex co-repressor. A més, diversos estudis han suggerit que C-ter facilita la unió de MeCP2 al nucli del nucleosoma (Chandler i col. 1999), i altres estudis indiquen que aquest domini podria contribuir a l'estabilitat de la proteïna (Yusufzai & Wolffe, 2000).

Diverses regions dins l'extrem C-ter tenen homologia amb algun membre de la família *forkhead* de factors específics de cervell, BF1 (HFK1) i HFK4 (Vacca i col. 2001, i anàlisis personals). Una de les regions d'homologia és un domini ric en prolines. En el cas de MeCP2, no obstant, els nostres resultats demostren que aquest domini és prescindible per a la proteïna, ja que hem pogut estudiar casos familiars amb individus sans portadors de petites deleccions en pauta en aquesta regió (Moses & Armstrong, enviat). Estem parlant d'un petit domini dins de la regió C-ter (residus 379 a 393), la pèrdua del qual no té implicacions fenotípiques. D'altra banda, deleccions grans en pauta o causants de PTC amb pèrdua de pocs residus, han estat detectades en casos familiars de retard mental inespecífic lleu (Yntema i col. 2002a) i en pacients aïllats amb fenotip no-RTT (Laccone i col. 2002).

D'aquests resultats s'infereix que la regió C-ter té dominis prescindibles i dominis no prescindibles per a una correcta funció de MeCP2, els quals haurien de ser definits de forma precisa. Es conclou que les deleccions causants de PTC són patogèniques, mentre que les deleccions en pauta poden ser mutacions o polimorfismes depenent de la regió delecionada, fet a tenir molt en compte a l'hora de realitzar el diagnòstic genètic d'un pacient i el consell genètic familiar.

## 2.2 L'RTT: una malaltia causada per un únic gen?

### 2.2.1 Altres estratègies per cercar mutacions en el gen *MECP2*

L'anàlisi de mutacions del gen *MECP2* ha permès explicar el 80% de pacients amb RTT clàssica, el 50% de formes atípiques i menys del 30% dels casos familiars. La resta de pacients no tenen mutació coneguda, i està encara en dubte si hi ha altres gens implicats en la patologia o si les mutacions poden localitzar-se en les àmplies regions no codificants de *MECP2*. Les tècniques emprades en la cerca de mutacions han estat diverses en els diferents grups (SSCP/HD, seqüenciació, DHPLC, *Southern blot*, PCRs llargues i FISH), però l'espectre de mutacions trobat ha estat el mateix. Fins al moment, l'anàlisi s'ha restringit a l'estudi genòmic de la regió codificant del gen *MECP2*. No s'ha publicat cap estudi que hagi abordat les regions no codificants, amb l'excepció del grup de Bourdon i col. (2001) que va seqüenciar la regió 3'UTR fins el primer senyal de poliadenilació en 34 pacients RTT, trobant tres canvis (tres insercions de Citosina en un tracte poli-C) presents també en població control (freqüència relativa 3,5%).

### 2.2.1.1 Cerca de mutacions en el gen *MECP2* a nivell d'RNA

Amb la finalitat de trobar mutacions que escapessin als mètodes fins ara utilitzats, vam iniciar la posada a punt de l'anàlisi de mutacions del gen *MECP2* a nivell d'RNA. Ars i col. (2001) acabaven de publicar els resultats de l'anàlisi de mutacions del gen *NF-1* en pacients afectats de Neurofibromatosis. Els autors comparaven els resultats de les mutacions detectades prèviament a nivell genòmic amb els resultats de l'estudi mutacional realitzat a partir de cDNA, utilitzant la tècnica cDNA-SSCP/HD. El nou abordatge els va permetre identificar un alt nombre de mutacions causants d'*exon skipping* i *intron inclusion* que escapaven les metodologies convencionals basades en l'estudi del DNA. Canvis intrònics, substitucions en regió codificant que es consideren silencioses, així com mutacions amb canvi o pèrdua de sentit, poden afectar els patrons d'*splicing* de l'mRNA o la seva eficiència, i no són detectables ni predivibles a nivell genòmic (Maquat 2001). D'altra banda, s'ha descrit que una fracció significativa (15%) de les mutacions causants de malalties en mamífers afecten els processos d'*splicing* (Krawzac i col. 1992).

Amb aquestes premisses, el nostre primer objectiu va ser estudiar el transcrit curt sencer (1,8 Kb), incloent la regió descrita del primer exó no codificant de *MECP2*, i analitzar l'existència de canvis en el seu patró de migració per cDNA-SSCP/HD. Durant la posada a punt de les tècniques d'RT-PCR vam observar l'existència de dos productes d'amplificació. Ambdós productes es corresponien a dos transcrits divergents a 5', causats per un *splicing* alternatiu de l'exó 2, fins ara no descrit. Els estudis previs en cDNA s'havien realitzat abans de la descripció de l'exó 1, de manera que el nou transcrit no podia ser detectat, i les anàlisis prèvies per *Northern* no permetien discriminar dos mRNAs de longitud tan similar. Aquest transcrit format pels exons 1-3-4 podria donar lloc a proteïna utilitzant un codó ATG localitzat al primer exó, fins ara considerat com a no codificant, seguint la mateixa pauta de lectura que MeCP2. Aquesta nova isoforma seria 12 aminoàcids més llarga i diferiria en els primers 21 aminoàcids de l'extrem N-terminal, respecte de la descrita. Els programes d'anàlisi no prediuen cap domini funcional en la regió.

L'existència del transcrit alternatiu està descrita a la base de dades d'EST, però aquest no ha estat mai clonat. D'altra banda, la descripció del primer exó de *MECP2* per Reichwald i col (2000) es va realitzar en el context d'un projecte de seqüenciació de la regió i per comparació amb la regió sintènica de ratolí. Per aquests motius, el punt d'inici de transcripció del gen *MECP2* no està definit i queden diverses qüestions per resoldre: On s'inicia el primer exó? És realment codificant i alhora forma part del promotor? Recordem que els estudis d'EMSA i CEMSA realitzats en aquesta tesi (Cap. 3) demostren que l'exó 1 de *MECP2* contén dianes d'unió a TFs, un dels quals sembla específic de SN. Caldrà analitzar, per tant, si el transcrit alternatiu té significació biològica i esbrinar si dóna lloc a la isoforma de MeCP2 predita per seqüència. Ambdós transcrits podrien tenir una funció diferencial dependent de teixit i/o les dues isoformes podrien estar implicades en el control de l'expressió de diferents gens diana. Queda pendent també l'objectiu inicial d'aquest estudi: l'anàlisi de mutacions que afectin l'expressió del gen *MECP2* en les pacients RTT en cDNA.

Fins a la data, els resultats publicats sobre regions no codificants s'han centrat en una petita porció de la regió 3'UTR (Bourdon i col. 2001). Estudis funcionals han permès conèixer que 3'UTR s'expressa diferencialment en els diferents teixits i al llarg del desenvolupament (Lewis i col. 1992; Coy i col. 1999). El transcrit llarg és el més abundant en cervell i podria estar implicat en els nivells més elevats de MeCP2 en aquest teixit, així com en el canvi en l'abundància del transcrit llarg a favor del curt que sembla produir-se en cervell a mesura que progressa la maduració neuronal

postnatal (LaSalle i col. 2001; Balmer i col. 2002). No es descarta, per tant, l'existència de mutacions en aquesta regió no codificant en les pacients RTT. No obstant, la regió 3'UTR té una extensió de 8 Kb la qual dificulta la seva anàlisi i, malgrat té regions altament conservades, l'estudi funcional dels canvis que es poguessin trobar en aquesta regió seria de difícil abordatge i requeriria teixit nerviós, ja que en teixits de més fàcil obtenció els seus nivells d'expressió són molt baixos. Sabem des de l'any 2000 que el grup liderat per H. Zoghbi ja havia iniciat l'estudi de la regió 3'UTR per seqüenciació directa en pacients RTT, però fins el dia d'avui no hi ha resultats publicats d'aquestes anàlisis.

Per tots aquests motius, i tenint en compte les limitacions del nostre grup, en el moment de plantejar-nos l'estudi de mutacions en regions no codificants vam decantar-nos per l'anàlisi de la regió 5'UTR.

### 2.2.1.2 Cerca de mutacions en la regió 5' del gen *MECP2* a nivell de DNA

Paral·lelament als estudis en cDNA, es va analitzar la regió 5'UTR del gen *MECP2* en DNA genòmic, treball realitzat parcialment per E. González i que va ser presentat com a Màster en Biologia Experimental amb el títol: "Análisis de la región 5'UTR del gen *MECP2* y análisis de mutaciones del gen *KAISO* en pacientes con síndrome de Rett sin mutación identificada en *MECP2*" al departament de Genètica, Facultat de Biologia, UB, el febrer d'aquest any. L'anàlisi de la regió 5'UTR realitzat per E. González en DNA es va dur a terme mitjançant la tècnica d'SSCP/HD, i no es va acabar de completar per a tota l'extensió de la regió. La tècnica d'SSCP/HD té una sensibilitat variable en funció de la seqüència a analitzar i del nombre de variacions en les condicions experimentals. Seria necessari seqüenciar tota l'extensió de la regió per determinar amb certesa el nombre de canvis en les pacients, i estudiar posteriorment el seu efecte funcional per determinar-ne la patogenicitat. Es van estudiar 65 pacients RTT sense mutació en regió codificant, i es van trobar dos canvis *de novo* en tres pacients a la regió promotora del gen. Un d'ells va ser caracteritzat: -5134delC, localitzat a l'exó 1. Aquest canvi podria donar lloc a una expressió alterada de MeCP2 en la pacient portadora. Els estudis realitzats mostren que és un lloc d'unió de proteïnes i hi prediuen dianes per a diversos TFs, un d'ells específic de cervell: els estudis de EMSA i CEMSA realitzats amb extractes proteics de cultiu de neuroblastoma van mostrar que hi havia pèrdua d'una unió, específica d'aquestes cèl·lules, quan s'utilitzava la sonda corresponent a la seqüència mutada de la pacient. Actualment, el grup liderat pel Dr. Manel Esteller al CNIO, està realitzant experiments per identificar el TF que s'uneix a aquest primer exó de *MECP2*.

Com ja s'ha comentat anteriorment, en l'RTT hi ha una pregunta fonamental per a la que encara no s'ha trobat resposta: si estem davant d'una malaltia neurològica i *MECP2* té una expressió ubíqua, per què el cervell és l'òrgan més greument afectat i la malaltia es manifesta a l'any de vida? *MECP2* dona lloc, en principi, a una proteïna única, però sabem que l'expressió dels seus dos transcrits principals, divergents només a 3'UTR, varia segons els teixits i l'etapa del desenvolupament (Coy i col. 1999; D'Esposito i col. 1996, Shahbazian i col. 2002a). Des del moment que no es coneixen els gens diana de MeCP2, no es pot discernir si MeCP2 actua com a repressor global de la transcripció gènica (compatible amb l'expressió ubíqua del gen) o com a controlador d'un número de gens importants en el desenvolupament (compatible amb l'expressió dels diferents transcrits i amb les seqüències clíniques de la seva disfunció). Calen més estudis per a poder donar resposta a la pregunta formulada, els quals impliquen la interconnexió de diverses disciplines, tals com genòmica, proteòmica i clínica.



### 2.2.2 Homogeneïtat/heterogeneïtat genètica de l'RTT

Aquesta tesi s'ha basat en la hipòtesi que l'RTT podria estar causada per mutacions en un únic gen, el gen *MECP2*. Hem identificat mutació en el 67% de les pacients i hem intentat abordar altres estratègies de cerca de mutacions per incrementar aquest percentatge. Hem pogut detectar una deleció en el primer exó de *MECP2*, possiblement amb efectes patològics sobre l'expressió del gen en SNC. Els nostres estudis, però, han quedat incomplets. L'extensió de les regions no codificants del gen i la troballa d'una possible mutació en regió promotora donen peu a continuar la cerca de mutacions en *MECP2*. No obstant, els estudis en DNA són altament laboriosos i sovint de difícil interpretació, especialment en regió no codificant, ja que no es pot predir l'expressió-funció a nivell proteic d'un canvi trobat a nivell genòmic no codificant. Les anàlisis en cDNA s'haurien de centrar en el transcrit de 10Kb, perquè s'ha vist que aquest transcrit està implicat, d'alguna manera, en l'expressió diferencial de la proteïna. Ja hem comentat, no obstant, les dificultats metodològiques inherents a l'estudi del transcrit llarg.

Una estratègia alternativa d'estudi seria realitzar un primer crivatge a nivell proteic de les pacients sense mutació en regió codificant, seleccionant per estudi genètic aquelles que presentessin una expressió de MeCP2 disminuïda o alterada. Aquests estudis per tècniques de *Western blot* i immunocitoquímiques no s'han realitzat fins la data. La troballa de pacients RTT sense mutació a *MECP2* i sense alteracions proteiques seria un indicatiu que hi ha altres gens implicats en la patologia. Respondre aquesta qüestió té transcendència tant a nivell clínic com a nivell bàsic, i és un camp d'intensa investigació.

El nostre grup va realitzar l'estudi d'un gen candidat funcional i posicional per l'RTT: el gen *KAISO*, treball realitzat per E. González. *KAISO* mapa a Xq23, té una expressió ubíqua i dona lloc a una proteïna que, tot i no pertànyer a la família de proteïnes amb domini d'unió a DNA metilat, és un repressor transcripcional dependent de metilació de la família *zing finger POZ/BTB* (Daniels & Reynolds, 1999). Les pacients d'aquesta tesi negatives per a *MECP2* van ser analitzades per al gen *KAISO*. No es va trobar cap mutació en regió codificant, resultat que descarta, en principi, que *KAISO* estigui implicat en la patogènesi de l'RTT. Estudis amb ratolins *KO* realitzats per altres grups van descartar que el gen *MBD2* estigués implicat en la malaltia, i van comprovar que MBD2 i MeCP2 actuen en vies diferents (Guy i col. 2001). Els estudis realitzats per Turner i col. (2003) han descartat també les proteïnes MBD1 i MBD2, ja que no han trobat mutació en els seus gens en pacients amb RTT, ni en pacients amb altres trastorns neurològics. Molt recentment el grup de Roloff i col. (2003) ha obert un nou camp d'investigació: proteïnes amb domini MBD que no requereixen la unió al DNA per inhibir la transcripció gènica, l'estudi de les quals serà interessant en l'RTT. Malgrat els esforços, però, els resultats obtinguts fins a la data no han permès aclarir si l'RTT és homogènia o heterogènia genèticament.

El grup dirigit per Dr. M. Esteller al CNIO, ha realitzat estudis de *microarrays* a partir de línies limfoblastoides de pacients RTT amb i sense mutació, totes elles amb presentació clàssica, analitzades i remeses des del nostre laboratori. L'objectiu ha estat identificar gens amb expressió alterada en les pacients respecte d'individus control. Els resultats, (Ballestar i col. en preparació) mostren que totes les pacients RTT (N= 10) tenen 10 gens desregulats de forma consistent, independentment de la presència/absència de mutació identificada a *MECP2* (tots ells són gens implicats en el desenvolupament neurològic). Com a dada important en relació a la nostra pregunta, Ballestar i col. (en preparació) han detectat un gen sobreexpressat només en pacients RTT sense mutació, i no en pacients amb mutació identificada (comunicació personal). Aquesta troballa podria anar a favor de l'existència d'heterogeneïtat genètica en l'RTT.

Els estudis d'exclusió en el cromosoma X realitzats abans que s'identifiqués el gen *MECP2* com a causant de l'RTT, mapaven el gen en dues possibles regions del cromosoma X: Xq28 i Xp22-p11. El segon locus per l'RTT podria residir en al regió Xp22-p11, on s'ha trobat cosegregació per alguns marcadors en casos familiar (Villard i col. 2000).

## 2.3 Correlacions genotip-fenotip

### 2.3.1 Anàlisis de les correlacions genotip-fenotip

Des que es va identificar el gen *MECP2* com a causant de l'RTT, diversos grups han intentat analitzar l'existència de correlacions entre els diferents tipus de mutacions i la seva localització, amb la variabilitat dels diferents paràmetres clínics dels pacients. Els estudis realitzats difereixen en els resultats obtinguts. Hi ha grups que han trobat correlació entre el tipus de mutació (mutació amb canvi de sentit o MS, i mutació causant de proteïna truncada o PTC) i la gravetat clínica de la malaltia, de manera que les mutacions MS s'associen amb un fenotip més lleu d'RTT que les PTC (Cheadle i col. 2000; Huppke i col. 2002). Altres grups, en canvi, no han trobat correlació significativa entre el tipus de mutació i la gravetat clínica (Wan i col. 1999; Vacca i col. 2001; Nielsen i col. 2001). Aquesta discordança de resultats pot ser deguda, en part, a que el patró d'XCI deu influir el fenotip de la pacient (Shahbazian & Zoghbi, 2002; Weaving i col. 2003). A més, les sèries analitzades sovint són reduïdes, i molts estudis analitzen només el subgrup de pacients amb forma clàssica d'RTT. Bàsicament, però, les discordances entre els resultats dels diversos grups són degudes a la utilització d'escala d'avaluació o *check list* diferents, amb variació dels paràmetres clínics analitzats i de les puntuacions assignades a cada paràmetre, de manera que els resultats que s'obtenen no són comparables. El grup australià liderat per H. Leonard (Colvin i col. 2003), ha publicat recentment un article en el ha analitzat un elevat número de pacients, comparable al nostre, utilitzant els diferents *check list* descrits a la literatura: l'escala clínica de Kerr (Cheadle i col. 2000), l'escala clínica de Percy (Amir i col. 2000) i l'escala clínica de Pineda (Monrós i col. 2001). La comparació dels resultats obtinguts amb les diferents escales d'avaluació mostra que l'escala que ofereix una valoració més ajustada dels paràmetres clínics mesurables és la de Pineda, i és també la que permet obtenir correlacions més significatives, ja que és independent de l'edat de la pacient i no mesura paràmetres sobre els que influeixen factors ambientals. Tot i així, l'estudi conclou que queden buits en el diagnòstic i interrogants sense resoldre ja que, com mostren els nostres propis resultats, individus amb la mateixa mutació tenen sovint una presentació clínica diferent.

No obstant, l'escala de Pineda publicada a Monrós i col. (2001) (Cap.2) va ser revisada i millorada posteriorment, tal com es presenta a Armstrong i col. (en preparació) (Cap.2). La Dra. M. Pineda, neuropediatra de l'Hospital Sant Joan de Déu i una de les impulsores de l'estudi multidisciplinar sobre l'RTT a Espanya, fruit del qual va sorgir aquesta tesi, va ser convidada a participar en la reunió que es va realitzar a Baden Baden l'any 2001, dins del marc de la Reunió de la *European Society of Paediatrics Neurology*, per revisar els criteris diagnòstics de l'RTT i les seves variants definits per Hagberg i col. (1985). Els criteris revisats van ser publicats per Hagberg i col. (2002) i són els que es descriuen a la Introducció, pàg. 6. La clínica de la nostra sèrie de pacients va ser revaluada molt acuradament després de Baden Baden, en base als nous criteris. El nostre estudi, a diferència d'altres, inclou pacients amb forma clàssica i pacients amb formes variants que compleixen tots els criteris diagnòstics i de suport. Les mutacions trobades en la regió codificant del gen *MECP2* expliquen un 77% de les formes clàssiques i un 46% de les variants. Dins

les variants, els percentatges també varien segons la forma clínica: forma amb llenguatge conservat (90%), forma congènita (48%) i fruste (42%). En canvi, no s'ha trobat mutació en cap pacient amb epilèpsia precoç (N= 4) ni amb regressió tardana (N= 2). La resta de grups tampoc no han trobat mutacions en les pacients amb epilèpsia precoç, fet que fa sospitar que podria representar una entitat clínica diferent. Els resultats de les correlacions obtinguts en la sèrie completa de pacients amb la nova escala d'avaluació (Armstrong i col. en preparació) van donar suport als obtinguts en el treball anterior (Monrós i col. 2001). Les mutacions MS correlacionen significativament amb una presentació clínica més lleu que les mutacions PTC, i vam poder realitzar noves correlacions en aquest darrer estudi no analitzades per altres grups. Així per exemple, les pacients amb delecions en el domini C-ter presenten valors de severitat menors que les pacients amb grans reordenaments gènics.

Si comparem les associacions significatives de la nostra sèrie amb les d'altres grups observem que, tot i que no s'ha utilitzat el mateix *check list*, alguns trets clínics correlacionen significativament en els diferents estudis. Huppke i col. (2002) van observar que pacients portadores de mutacions MS tenien més capacitat de caminar que les pacients portadores de PTC ( $p=0,031$ ), coincidint amb els nostres resultats (Armstrong i col. en preparació). En els nostres resultats, a més, observem que les pacients amb mutació MS tenen més capacitat per seure ( $p=0,015$ ) i pateixen menys disfuncions respiratòries ( $p=0,046$ ) que les pacients amb mutació PTC, resultats no obtinguts per cap altre grup. Tant el grup de Huppke i col. (2002) com el grup de Cheadle i col. (2000) coincideixen amb els nostres resultats pel que fa a la gravetat de la malaltia, ja que s'observa que pacients amb mutació MS presenten una clínica més lleu que pacients amb mutació PTC.

D'altra banda, el grup de Huppke i col. (2002) també va comparar les mutacions segons la seva localització, i observà que les pacients amb mutacions situades en el domini MBD tenen més capacitat d'utilitzar les mans que les pacients amb mutació en el domini TRD. Aquesta correlació no ha estat observada en el nostre estudi. Segons els resultats obtinguts en la nostra sèrie, la capacitat de seure i caminar s'associen significativament amb les pacients amb mutació en l'MBD, ja que les pacients amb mutació en el TRD tendeixen a perdre aquestes adquisicions o no les adquireixen ( $p=0,027$  i  $p=0,032$ , respectivament). Els nostres estudis també han trobat correlació de la gravetat de la malaltia amb la localització de la mutació, ja que hem observat que les mutacions en l'MBD estan associades a una clínica més lleu que mutacions en el TRD ( $p=0,047$ )

No obstant, vam poder constatar amb l'estudi de les mutacions recurrents que, a nivell individual, aquestes es troben en pacients amb presentacions clíniques molt diverses. Només les pacients portadores de mutacions MS es mantenen dins un rang concret de puntuació de severitat que rarament supera l'*score* de 15 punts, punt de tall a partir del qual es considera clínica severa. En canvi, les pacients amb mutació PTC poden presentar qualsevol grau de severitat, encara que el 45% es situen en el rang de les formes més greus de la malaltia. Per exemple, per a la mutació T158M, 13 pacients tenen una forma clàssica, una pacient presenta la variant forma fruste, i només una pacient presenta una forma clínica severa d'inici precoç. En canvi, de les pacients portadores de la mutació R168X, nou presenten la forma clàssica, tres presenten la variant amb llenguatge conservat (considerada com a una variant molt lleu de l'RTT) i tres pacients presenten la variant d'inici precoç o forma congènita, que és la més greu.

En relació a les mutacions recurrents, Leonard i col. (2003) acaben de publicar un article en el que obren la possibilitat de realitzar correlacions genotip-fenotip mutació per mutació, en relació a cada paràmetre clínic de cada pacient. D'aquesta manera han pogut analitzar, per exemple, la mutació R133C en nou pacients i han observat que aquestes comparteixen una



sèrie de trets clínics: totes han après a caminar i conserven la marxa, han desenvolupat llenguatge propositiu i utilitzen les mans. D'altra banda, l'escoliosi, les disfuncions respiratòries i els trastorns del son són menys comuns en aquestes pacients que en la resta de pacients RTT. De les sis pacients RTT amb mutació R133C de la nostra sèrie, l'únic tret clínic que comparteixen totes elles és que han après a caminar i conserven la marxa. No comparteixen ni el desenvolupament del llenguatge (només una pacient l'ha desenvolupat) ni la utilització de les mans, que només mantenen dos pacients. No hem observat cap tret clínic que sigui més/menys comú en aquestes pacients respecte a la resta.

### 2.3.2 Mutacions en el gen *MECP2* en barons

Thomas (1996) va hipotetitzar una elevada proporció de mutació en línia germinal masculina respecte de la femenina en malalties dominants *de novo* lligades al cromosoma X, com l'RTT. Segons aquesta hipòtesi, la falta de barons afectats es deu principalment a que els barons no reben el cromosoma X del pare. Els primers casos de barons amb mutació al gen *MECP2* van ser descrits en casos familiars amb germanes afectes d'RTT (Amir i col, 1999 i 2000; Wan i col. 1999; Cheadle i col. 2000), deguts a una herència materna de la mutació. Els nens, no obstant, presentaven encefalopatia congènita severa, hipotonia i greus dificultats respiratòries, i morien durant els primers mesos de vida.

Posteriorment es van trobar mutacions *de novo* al gen *MECP2* en barons amb fenotip RTT, la supervivència dels quals es devia a la presència d'un mosaic somàtic per a la mutació, o bé a l'associació amb una síndrome de Klinefelter total o parcial. En ambdós casos, els pacients disposen d'un percentatge de cèl·lules amb una còpia de *MeCP2* funcional (Hoffbuhr i col. 2001; Leonard i col. 2001; Schwartzman i col. 2001; Armstrong i col. 2001; Vorsanova i col. 2001; Topçu i col. 2002; Maiwald i col. 2002). Nosaltres hem presentat el primer cas publicat d'un nen amb RTT clàssica i cariotip 46XY, que compleix tots els criteris necessaris, 7 dels 8 criteris de suport i cap criteri d'exclusió, segons els nous criteris diagnòstics per a l'RTT (Hagberg i col. 2002). El pacient, que en l'actualitat té 16 anys, presenta mosaïcisme somàtic per a la mutació R133H en el gen *MECP2*. Un altre cas descrit de mosaïcisme somàtic per a una mutació a *MECP2* va ser reportat per Clayton-Smith i col. (2000) en un pacient baró amb síndrome d'Angelman. Aquestes troballes reforcen l'observació que el gen *MECP2* presenta una elevada taxa de mutació, i fan pensar que una fracció de dones RTT sense mutació detectada podrien ser mosaics, la qual cosa dificultaria la detecció de la mutació en heterozigosi. Donat que l'RTT és una entitat clínica inclosa dins l'espectre autista i que el gen *MECP2* és responsable d'un gran ventall de presentacions clíniques de la malaltia, el nostre grup va iniciar l'any 2002 un nou projecte titulat: *Autisme: Estudi i classificació de pacients dins l'espectre autista, i implicacions del gen MECP2 (Xq28) i de gens candidats funcionals de les regions 15q11-q13 en l'autisme associat a retard mental*, en el que es pretenia estudiar el gen *MECP2* en els pacients autistes menys funcionals. Vam analitzar la regió codificant del gen *MECP2* en 50 pacients autistes amb retard mental, sense detectar cap mutació. Només en un pacient vam detectar el canvi IVS-17delT, amb un origen *de novo*, el qual suposem que és un polimorfisme ja que va ser detectat també en una germana sana de la nostra sèrie de famílies RTT. No obstant, aquest polimorfisme recurrent detectat en població RTT està actualment essent estudiat pel nostre grup en població control, per avaluar la seva freqüència i descartar que no es tracti d'un factor modulador dins l'espectre autista. L'absència de mutacions a *MECP2* en la nostra sèrie de pacients autistes coincideix amb els resultats d'altres grups, publicats recentment (Vourc'h i col. 2001; Beyer i col. 2002). Sembla definitiu que l'autisme amb o sense retard mental no està associat amb el gen *MECP2*, i que constitueix una entitat genètica complexa, diferent de l'RTT (Beyer i col. 2002; Lobo-Menendez i col. 2003; Zappella i col. 2003).

El retard mental inespecífic, en canvi, sí podria estar associat en alguns casos a mutacions lleus en el gen *MECP2*, tal com s'ha comentat àmpliament a la Introducció.

### **2.3.3 Consell genètic als familiars de pacients amb RTT**

Un dels avantatges de realitzar la tesi doctoral en un Hospital és la possibilitat d'estar en contacte amb els pacients i familiars. Les mostres a analitzar deixen de ser un número i es converteixen en cares i persones, i vivències i ansietats i desigs. Per damunt de tot, estem treballant amb persones, les quals en aquests anys de tesi ens han plantejat moltes preguntes a nivell diagnòstic i de futur. A mesura que hem anat avançant en l'estudi de la malaltia, la seva herència, el risc real de recurrència i la possibilitat de trobar barons afectats, hem estat capaços de donar un consell genètic a les famílies i d'oferir la realització d'un diagnòstic prenatal.

Els estudis realitzats per Trappe & Laccone (2001) van demostrar l'origen patern de la mutació en la gran majoria de casos RTT esporàdics, i un origen matern de la mutació en els casos familiars. Com ja s'ha comentat en el Capítol 2, vam comprovar l'origen *de novo* de totes les mutacions trobades en les pacients RTT, mitjançant l'anàlisi dels progenitors i de les germanes sanes. Hi ha casos familiars descrits amb mares asimptomàtiques portadores de la mutació, que tenen un risc d'un 50% de transmetre la malaltia, donat el caràcter dominant de l'RTT, i també hi ha casos familiars deguts a mosaïcisme germinal per a la mutació en un dels progenitors. En el nostre estudi, vam observar un cas de mosaïcisme germinal per a un polimorfisme, present en la pacient RTT (amb mutació identificada en la regió codificant del gen *MECP2*, causant de la malaltia) i en la seva germana sana, però no en els progenitors.

La possibilitat de realitzar un diagnòstic prenatal se'ns va plantejar des de bon principi. Encara que el risc de recurrència de l'RTT sigui molt baix, l'angoixa dels pares de tenir un altre fill amb RTT és tan gran que, sovint, opten per no tenir més descendència. Si la filla afecta té mutació detectada en el gen *MECP2*, el diagnòstic prenatal en el nou embaràs està indicat, encara que la mutació sigui *de novo*. El risc de mosaïcisme germinal no pot ser predit ni detectat, i la realització d'un diagnòstic prenatal en aquestes famílies fa disminuir el risc de recurrència per al fetus al risc de la població general.

Altres grups aconsellen també fer estudis familiars en l'RTT. En el treball de Gill i col. (2003) publicat en col·laboració per diferents centres diagnòstics i d'investigació en l'RTT (Regne Unit, Alemanya, Austràlia i Noruega), es descriuen 11 casos familiars d'RTT. Només en un cas es va identificar la mutació en les dues germanes afectes i en la mare portadora asimptomàtica, amb un patró d'inactivació de l'X totalment esbiaixat. En cinc famílies, es va trobar mutació a *MECP2* en una de les pacients, però no en la resta de familiars amb sospita diagnòstica d'RTT. En les cinc famílies restants, no es va identificar mutació en cap de les pacients RTT. Davant d'aquests resultats, que confirmen la raresa dels casos familiars d'RTT i fan disminuir la seva freqüència respecte de la descrita abans de l'anàlisi de *MECP2*, els autors aconsellen realitzar anàlisi de portadores sanes (germanes, mares i ties de nenes amb RTT i mutació identificada a *MECP2*) i diagnòstic prenatal als familiars que ho sol·licitin.

### **2.3.4 Present i perspectives diagnòstiques**

Podem concloure que *MECP2* està implicat en un espectre de trastorns del desenvolupament més gran del que inicialment s'esperava, i que l'RTT és una entitat clínica, no genètica. Les mutacions a *MECP2* poden donar lloc des de formes congènites d'RTT a dones portadores asimptomàtiques, des d'encefalopaties congènites greus a formes clàssiques en barons, a casos d'AS i a diferents tipus de retard mental inespecífic lligat al cromosoma

X, tant en barons com en dones. No sembla estar implicat, en canvi, en l'autisme ni en el trastorn desintegratiu. A més, el mosaïcisme somàtic pot ser un nou mecanisme per introduir variabilitat en les manifestacions fenotípiques de les mutacions del gen *MECP2*.

Degut a la gran heterogeneïtat clínica produïda per les mutacions a *MECP2*, seria convenient analitzar aquest gen no tant sols en l'RTT, sinó que també en altres patologies del neurodesenvolupament. S'està plantejant, per exemple, el seu estudi rutinari en pacients AS amb estudi molecular negatiu de la regió 15q11-q13, així com l'anàlisi de la mutació A140V en pacients amb retard mental idiopàtic, sindròmic i no sindròmic, negatius per a la síndrome del cromosoma X fràgil.

Un tema pendent en el que s'està investigant molt en els darrers mesos, és la identificació dels gens diana de *MECP2*. El seu coneixement permetrà anar entenent cada cop més la base molecular de la malaltia i el mecanisme d'acció de MeCP2 i, potser, trobar altre(s) gen(s) implicat(s) en l'RTT, que ens permetin explicar i diagnosticar el 20% de pacients RTT clàssiques sense mutació, el 50% de les pacients amb RTT atípic i el 70% dels casos familiars. Els camps de recerca són molt amplis, cada resposta genera noves preguntes, i queda molt per fer. ■

